



Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑯ Gesuchsnummer: 2060/92

⑰ Inhaber:
Cemitin S.A., Barbengo

⑯ Anmeldungsdatum: 30.06.1992

⑯ Erfinder:
Lewenstein, Ari, Dr., Lugano
Fouad, Habib K., Dr., Edinburgh (GB)
Jaton, Jean-Claude, Prof., Thônex

⑯ Patent erteilt: 15.04.1994

⑯ Vertreter:
E. Blum & Co., Zürich

⑯ Patentschrift veröffentlicht: 15.04.1994

⑮ Pharmazeutisches Präparat zur Hemmung unerwünschter Zellvermehrung bei Wirbeltieren, welches als Wirkstoff 2,4-Dihydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-on oder dessen Derivate enthält.

⑯ Es werden pharmazeutische Präparate zur Hemmung einer unerwünschten Zellvermehrung bei Wirbeltieren beschrieben, welche als Wirkstoff mindestens ein 2,4-Dihydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3 (4H)-on oder ein Derivat davon enthalten. Bei der unerwünschten Zellvermehrung der Wirbeltiere, die mit Hilfe dieser pharmazeutischen Präparate gehemmt werden kann, handelt es sich entweder um eine maligne Zellvermehrung von Krebszellen oder um eine benigne Zellvermehrung der Zellen verschiedener Gewebe, beispielsweise Drüsenzellen. Dementsprechend können die erfundungsgemässen pharmazeutischen Präparate sowohl zu einer Chemotherapie von Krebserkrankungen als auch zu einer Chemotherapie einer benignen unerwünscht hohen Zellvermehrung herangezogen werden, beispielsweise einer Vermehrung von Drüsenzellen, wie zum Beispiel bei der Behandlung der benignen Prostatahypoplasie.

Die in den pharmazeutischen Präparaten enthaltenen 2,4-Dihydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one oder Derivate davon können sowohl neue chemische Verbindungen sein, als auch solche, die bereits in der Literatur beschrieben sind, jedoch bisher nur in der agrochemischen Pflanzenbehandlung verwendet wurden.

Des weiteren werden neue 2,4-Dihydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-on und Verfahren zu deren Herstellung erläutert.



CH 683593 A5

Beschreibung

Unerwünschte Zellvermehrungen sind bei Wirbeltieren, und zwar sowohl bei kaltblütigen Wirbeltieren, wie Fischen, Lurchen und Reptilien, als auch insbesondere bei warmblütigen Wirbeltieren, wie Vögeln und Säugetieren, häufig anzutreffen. Unerwünscht hohe Zellvermehrungen sind insbesondere bei unterschiedlichen Arten der Krebserkrankungen anzutreffen, wie zum Beispiel bei der Ausbildung von Krebstumoren. Die unerwünscht hohen Zellvermehrungen können jedoch auch benigne erhöhte Zellvermehrungen sein, wie sie beispielsweise bei einem erhöhten Wachstum von verschiedenen Geweben anzutreffen sind, beispielsweise einem unerwünschten Anschwellen von Drüsen aufgrund erhöhter Zellvermehrung. Ein typisches Beispiel für eine benigne, zu starke Zellvermehrung, ist die benigne Prostatahyperplasie.

Obwohl eine grosse Anzahl an Wirkstoffen zur Behandlung von malignen und benignen, unerwünscht hohen Zellvermehrungen bekannt ist, besteht immer noch ein Bedürfnis nach neuen pharmazeutischen Präparaten, die eine selektive Hemmung der unerwünscht hohen Zellvermehrung, insbesondere der Vermehrung von Krebszellen, bewirken, und die andererseits eine geringe Toxizität aufweisen, beziehungsweise das Wachstum der gesunden, nicht entarteten Zellen, nicht beeinträchtigen. Des weiteren besteht ein grosses Bedürfnis nach entsprechenden pharmazeutischen Präparaten, die zur Hemmung spezieller, unerwünscht hoher Zellvermehrungen, wie zum Beispiel zur Behandlung von spezifischen Tumoren, besonders gut geeignet sind.

BESCHREIBUNG DES STANDES DER TECHNIK

Es sind verschiedene Wirkstoffe mit Antitumor-Aktivität bekannt, die sich von Derivaten des Hydroxyharnstoffes, beziehungsweise der Hydroxamsäure, ableiten. In diesen bekannten Verbindungen ist die Hydroxamsäuregruppierung der Formel



30

an einen organischen Rest gebunden, und sie weisen dementsprechend die folgende Grundstruktur A



35

auf, in welcher R eine NH₂-Gruppe ist (in diesem Falle ist die Verbindung A Hydroxyharnstoff) oder der Rest R bedeutet einen aliphatischen, einen araliphatischen, einen aromatischen oder einen heterocyclischen Rest. Es sei in diesem Zusammenhang beispielsweise auf die Veröffentlichung von Howard L. Elford und Bart Van't Riet in Pharmac. Ther., Band 29, Seiten 239 bis 254, 1985 verwiesen, in welcher eine Zusammenfassung verschiedener Substanzen mit Antitumoraktivität gegeben wird, die der oben angegebenen Formel A entsprechen.

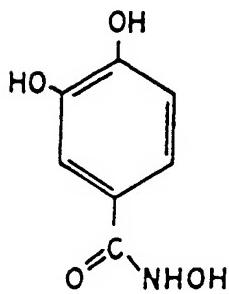
40 Von den Verbindungen mit Antitumor-Aktivität der Formel A wurden bisher zur Krebsbekämpfung hauptsächlich solche eingesetzt, in welchen der Rest R ein Benzolkern ist, der als Substituenten Hydroxygruppen, Methoxygruppen, Nitrogruppen und Aminogruppen aufweist, und als spezielles Beispiel für eine derartige Verbindung der Formel A sei die Verbindung mit der Bezeichnung Didox (3,4-Dihydroxybenzohydroxamsäure) genannt, welche die folgende Formel

50

55

60

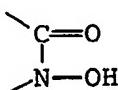
65



aufweist. Diese zuletzt genannte Verbindung weist ausserdem ein gutes Chelatbildungsvermögen für Eisen auf, und sie ist ferner ein Radikalfänger.

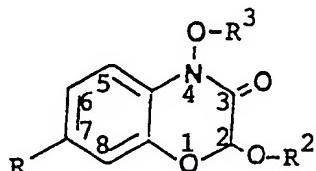
In den bereits bekannten Antitumormitteln der oben angegebenen Struktur A, ist jedoch an das Stickstoffatom der Hydroxamsäurestruktur der weiter oben angegebenen Formel ein Wasserstoffatom gebunden. Das entsprechende Stickstoffatom ist also nicht mit irgendeinem organischen Rest substituiert.

Insbesondere wurden bisher noch keine solchen Hydroxamsäurederivate als Wirkstoff in pharmazeutischen Präparaten verwendet, in welchen einer am Stickstoffatom organisch substituierter Rest der Hydroxamsäure einen Teil einer entsprechenden heterocyclischen Struktur darstellt, in welchen also in einem Heterocyclus eine zweiwertige Gruppierung der Struktur



vorliegt.

Mehrere Verbindungen, in welchen der Rest der Hydroxamsäure oder ein Derivat desselben eine zweiwertige Struktur darstellt, die einen Teil eines heterocyclischen Gerüstes bildet, sind jedoch bereits in der Literatur beschrieben. Es sei in diesem Zusammenhang insbesondere auf das US Patent 3 862 180 verwiesen, in welchem Derivate von 2,4-Dihydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-onen beschrieben sind, welche der folgenden Formel B



B

50 entsprechen.

In diesen bekannten Derivaten des 2,4-Dihydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ones bedeutet

R Wasserstoff, Halogen, Niederalkoxy, Niederalkyl oder Aryl,

R^2 ist Wasserstoff, ein niedriger Alkylrest oder der Rest eines geschützten Glukosides und

R^3 bedeutet Wasserstoff, Alkyl oder Benzyl, wobei dann, wenn R^3 ein Wasserstoffatom darstellt, die entsprechenden Verbindungen auch in Form der Salze mit Metallen der Übergangselemente des Periodensystems vorliegen können.

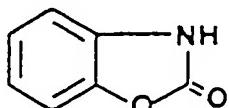
Die in dieser US Patentschrift beschriebenen Verbindungen der oben angegebenen Formel B weisen eine insektizide Aktivität auf.

Verbindungen, welche der oben angegebenen Formel B entsprechen, wurden bereits früher aus Pflanzen, isoliert, insbesondere aus Gräsern und Getreidearten, wie Mais, Reis, Weizen und Roggen. In den aus diesen Pflanzen isolierten Produkten bedeutet R^2 und R^3 ein Wasserstoffatom, und R stellt ein Wasserstoffatom oder eine Methoxygruppe dar. Die entsprechende Verbindung mit R in der Bedeutung eines Wasserstoffatoms ist das 2,4-Dihydroxy-1,4-benzoxazin-3(4H)-on, welches in der Literatur auch als DIBOA abgekürzt wird, und diejenige Verbindung der Formel B, in welcher R Methoxy ist, ist das 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-on, welches in der Literatur auch als DIMBOA abge-

65

kürzt wird. Aus den Gräsern und Getreidearten wurden ferner die diesen beiden genannten Verbindungen entsprechenden Glukoside isoliert, in welchem also R² ein glukosidisch gebundener Glucoserest ist, R³ Wasserstoff bedeutet und R Wasserstoff oder eine Methoxygruppe ist. Des weiteren wurde in den entsprechenden Pflanzen auch das Benzoxazolinon der folgenden Formel

5



10

gefunden, von dem man annimmt, dass es ein Abbauprodukt des DIBOA ist.

Von der grossen Anzahl an Veröffentlichungen, in welchen die aus Pflanzen isolierten Produkte DIBOA und DIMBOA beschrieben sind, sei beispielsweise auf die folgenden verwiesen:

15

Virtanen et al., O. Suomen.Kemistilehti B, 32, 252 (1959);
Walroos et al., Acta. Chem. Scand., 13, 1906 (1959); und
Virtanen, Angew. Chem. International Edit., 1, 299 (1962).

20

In dem US Patent 3 862 180 wird ferner ein Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der oben angegebenen Struktur B beschrieben, bei dem der heterocyclische Ring gebildet wird, in dem ein entsprechendes Benzolderivat, in welchem in der ortho-Stellung zu der hydroxy-substituierten Aminogruppe eine Methoxygruppe gebunden ist, die sowohl einen Niederalkoxysubstituenten als auch einen Carbonsäureestersubstituenten aufweist, wobei der heterocyclische Ring durch Bildung des inneren Säureamides zwischen der an den Methoxysubstituenten gebundenen Carbonsäureestergruppe und dem Wasserstoffatom der hydroxysubstituierten NH-Gruppe erfolgt.

25

Ein zu besseren Ausbeuten führendes und leichter durchführbares Verfahren zur Herstellung der speziellen Verbindung der Formel B mit der Bezeichnung DIBOA ist ferner in der DDR-Patentschrift 264 694 beschrieben. In dieser DDR-Patentschrift wird ferner hervorgehoben, dass diese Verbindung aufgrund ihrer antibakteriellen, fungiziden und insektiziden Aktivität von besonderem Wert in der Landwirtschaft ist, insbesondere um mit ihrer Hilfe gegen Schadeflüsse resistente Sorten von Kulturpflanzen züchten zu können. Des weiteren ist auch bekannt, dass DIBOA das Wachstum von Pflanzen beeinflusst, und zwar sowohl von zweikeimblättrigen Pflanzen, wie Kresse, als auch von einkeimblättrigen Pflanzen, wie bestimmten Grasarten. Überraschenderweise wird das Wachstum der Wurzeln und Keimlinge von Kressen bei ganz geringen Konzentrationen (0,09 Millimolar) von DIBOA stimuliert, bei höheren Konzentrationen jedoch gehemmt (siehe die Veröffentlichung von Barnes, J.P.; Putnam, A.R.; Burke, B.A. und Aasen, A.J. in Phytochemistry, 26(5), 1385-90 [siehe auch CA107(13):112630q]).

35

Obwohl also seit langem bekannt ist, dass von den in der Literatur beschriebenen Verbindungen der oben angegebenen Formel B einige neben der Insektiziden Wirksamkeit auch eine bakterizide und fungizide Wirksamkeit besitzen, so wurden dennoch die entsprechenden Wirkstoffe und insbesondere der in diesem Zusammenhang am besten untersuchte Naturstoff DIBOA bisher ausschliesslich zur Behandlung von Pflanzen eingesetzt, nicht jedoch als Wirkstoff in entsprechenden pharmazeutischen Präparaten zur Behandlung von Tieren und Menschen.

40

Es wurde jetzt überraschenderweise gefunden, dass 2,4-Dihydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one, und zwar sowohl bereits bekannte entsprechende Verbindungen, die unter die oben angegebene Formel B fallen, als auch neue Derivate, die Eigenschaft besitzen, eine unerwünschte Zellvermehrung von lebenden Zellen von Wirbeltieren zu hemmen, und zwar sowohl eine entsprechende maligne Zellvermehrung als auch unerwünscht hohe benigne Zellvermehrungen.

BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

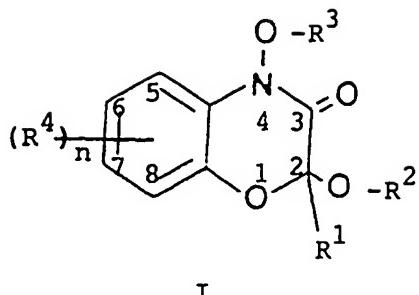
50

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist dementsprechend ein pharmazeutisches Präparat zur Hemmung unerwünschter Zellvermehrung bei Wirbeltieren, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es als Wirkstoff mindestens ein 2,4-Dihydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one oder ein Derivat davon der Formel I

55

60

65



enthält, wobei in dieser Formel I

- 15 R¹ Wasserstoff, ein unsubstituierter Alkylrest mit 1–6 Kohlenstoffatomen, ein substituierter Alkylrest mit 1–6 Kohlenstoffatomen im Alkylteil, der als Substituenten 1–3 Substituenten trägt, die unabhängig voneinander aus der Gruppe ausgewählt sind, welche Halogenatome, Hydroxygruppen, Alkoxygruppen mit jeweils 1–6 Kohlenstoffatomen, Phenoxygruppen, Carbonsäuregruppen, veresterte Carbonsäuregruppen und Phenylreste umfasst, ein unsubstituierter Phenylrest, oder ein substituierter Phenylrest ist, der 1–3 Substituenten aufweist, welche aus der Gruppe ausgewählt sind, welche die Substituenten Alkyl mit 1–6 Kohlenstoffatomen, Hydroxy, Alkoxy, Acyloxy, Carbonsäuregruppen und Carbonsäureestergruppen und Halogenatome umfasst,
- 20 R² Wasserstoff, einen Acylrest der Formel



- 30 In welchem R¹ die oben angegebene Bedeutung besitzt, einen glykosidisch gebundenen Zuckerrest, einen unsubstituierten Alkylrest mit 1–6 Kohlenstoffatomen, einen substituierten Alkylrest mit 1–6 Kohlenstoffatomen im Alkylteil, der als Substituenten 1 bis 3 Substituenten trägt, die unabhängig voneinander aus der Gruppe ausgewählt sind, welche Halogenatome, Hydroxygruppen, Alkoxygruppen mit jeweils 1–6 Kohlenstoffatomen, Phenoxygruppen, Carbonsäuregruppen, veresterte Carbonsäuregruppen und Phenylreste umfasst, einen unsubstituierten Phenylrest oder einen substituierten Phenylrest bedeutet, der 1 bis 3 Substituenten aufweist, welche unabhängig voneinander aus der Gruppe ausgewählt sind, die Alkylgruppen mit 1–6 Kohlenstoffatomen, Hydroxygruppen, Alkoxygruppen, Acyloxygruppen, Carbonsäuregruppen, Carbonsäureestergruppen und Halogenatome umfasst,
- 35 R³ für ein Wasserstoffatom oder eine Acylgruppe der Formel



- 45 steht, in welcher R¹ die oben angegebene Bedeutung besitzt, n eine ganze Zahl im Bereich von 0–4 bedeutet, und die Substituenten R⁴ unabhängig voneinander für Alkylreste mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, substituierte Alkylreste mit 1–6 Kohlenstoffatomen im Alkylteil, die als Substituenten Hydroxygruppen, Alkoxygruppen, Phenoxygruppen oder Phenylreste tragen, freie oder verätherte Hydroxygruppen der Formel



- 60 stehen, wobei in diesen Gruppierungen R¹ die oben angegebene Bedeutung besitzt oder freie oder veresterte Carboxylgruppen, Halogenatome, unsubstituierte Phenylreste oder substituierte Phenylreste bedeuten, die 1–3 Substituenten aufweisen, welche aus der Gruppe ausgewählt sind, welche die Substituenten Alkyl mit 1–6 Kohlenstoffatomen, Hydroxy, Alkoxy, Acyloxy, Carbonsäuregruppen und Carbonsäureestergruppen und Halogenatome umfasst, oder der Rest R⁴ bedeutet einen glykosidisch gebundenen Zuckerrest oder 2 an benachbarte Kohlenstoffatome des Benzolkerns gebundene Reste R⁴ stellen gemeinsam eine Gruppe –O–CH₂–O– oder –O–CH₂–CH₂–O dar, oder dass das pharmazeutische Präparat ein pharmazeutisch annehmbares Salz einer Verbindung der Formel I enthält.
- 65

Die in den erfindungsgemässen pharmazeutischen Präparaten enthaltenen Wirkstoffe der Formel I umfassen sowohl neue chemische Verbindungen als auch solche, die bereits in der Literatur beschrieben sind, wie zum Beispiel die Verbindungen der weiter vorne angegebenen Formel B, die in der US Patentschrift 3 862 180 beschrieben sind.

5 Sofern die erfindungsgemässen pharmazeutischen Präparate solche Wirkstoffe der Formel I enthalten, die bereits in der Literatur beschrieben sind, sind diese Verbindungen der Formel I bisher nur in Mitteln zur Behandlung von Pflanzen eingesetzt worden, beispielsweise als Insektizide, Herbizide oder Fungizide, nicht jedoch als Wirkstoff von irgendwelchen pharmazeutischen Präparaten, die zur Behandlung unerwünschter Zustände bei Wirbeltieren einsetzbar sind.

10 Die erfindungsgemässen pharmazeutischen Präparate betreffen also auch im Fall der Verwendung von bereits bekannten Verbindungen der Formel I als Wirkstoff eine erste medizinische Indikation dieser Wirkstoffe.

15 Die erfindungsgemässen pharmazeutischen Präparate sind zur Bekämpfung unerwünschter Zellvermehrungen bei kaltblütigen Wirbeltieren, wie Fischen, Lurchen und Reptilien geeignet, vorzugsweise werden sie jedoch zur Hemmung unerwünschter Zellvermehrung bei warmblütigen Wirbeltieren, nämlich Vögeln und Säugetieren, einschliesslich des Menschen, eingesetzt.

20 Die erfindungsgemässen pharmazeutischen Präparate können mit Vorteil zur Behandlung einer Krebserkrankung eingesetzt werden, um die unerwünschte Vermehrung der malignen Tumorzellen, nicht jedoch die Vermehrung der gesunden Zellen zu hemmen.

25 Die erfindungsgemässen pharmazeutischen Präparate sind jedoch auch zur Behandlung benigner, unerwünscht hoher Zellvermehrungen geeignet, beispielsweise zur Behandlung einer unerwünschten Vergrösserung von Drüsengewebe, wie zum Beispiel zur Behandlung von benigner Prostatahyperplasie.

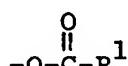
30 Die erfindungsgemässen pharmazeutischen Präparate enthalten als Wirkstoff vorzugsweise solche Verbindungen der Formel I, die im Benzolkern unsubstituiert sind, in welchen also n 0 ist, oder die im Benzolkern 1 oder 2 Substituenten R⁴ tragen, in welchen also n 1 oder 2 ist.

35 Von den im Benzolkern substituierten Verbindungen der Formel I sind diejenigen speziell bevorzugt, in welchen R⁴ ein unsubstituierter Alkylrest mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, vorzugsweise 1 bis 4 Kohlenstoffatomen, und speziell bevorzugt 1 oder 2 Kohlenstoffatomen, ist. Falls der entsprechende Alkylrest Substituenten trägt, dann sind Hydroxygruppen, Alkoxygruppen und Phenylreste bevorzugt, wobei auch in diesem Fall der substituierte Alkylrest vorzugsweise 1 oder 2 Kohlenstoffatome im Alkylrest aufweist, und dementsprechend sind Beispiele für substituierte und unsubstituierte Alkylreste, die als Substituenten R⁴ im Benzolkern auftreten können, Methylreste, Äthylreste, Isopropylreste, 2-Hydroxyäthylreste, Methoxymethylreste, Methoxyäthylreste, sowie Benzylreste.

40 Weitere bevorzugte Bedeutungen für Substituenten R⁴, die im Phenylrest auftreten können, sind freie oder verätherte oder acyierte Hydroxygruppen, also Substituenten, welche die folgenden Formeln



beziehungsweise



45 aufweisen, beziehungsweise die Reste R⁴ können auch glykosidisch gebundene Zuckerreste sein, also Reste der Formel



50 wobei Glu einen über eine Glykosidbindung gebundenen Zuckerrest darstellt, insbesondere einen Glucoserest oder einen Mannoserest. Als Beispiele für Reste R⁴ in der Bedeutung von verätherten Hydroxygruppen der oben angegebenen Formel, seien entsprechende Alkoxygruppen mit 1-6 Kohlenstoffatomen genannt, insbesondere solche mit 1-4 Kohlenstoffatomen, wobei Athoxygruppen und insbesondere Methoxygruppen bevorzugt sind, und ferner auch Araalkoxygruppen, insbesondere solche mit 1 oder 2 Kohlenstoffatomen im Alkylteil, speziell bevorzugt die Benzyloxygruppe. Des Weiteren können die verätherten Hydroxygruppen auch Phenoxygruppen sein, wobei der Phenylkern vorzugsweise unsubstituiert ist oder 1 oder 2 Substituenten trägt, wie sie im Zusammenhang mit der Definition des Restes R¹ erläutert wurden, insbesondere Alkyl oder Alkoxygruppen mit 1-3 Kohlenstoffatomen.

55 Falls die Reste R⁴ die Bedeutung von acylierten Hydroxygruppen der angegebenen Formel aufweisen, dann sind entsprechende Acylreste, die sich von niederen aliphatischen Carbonsäuren, wie Ameisensäure, Essigsäure und Propionsäure ableiten, sowie Acyleste, die sich von aromatischen Säuren ableiten, wie Benzoesäure oder Salicylsäure, speziell bevorzugt.

60 Die Reste R⁴ können jedoch auch freie oder veresterte Carboxylgruppen bedeuten. Im Falle der veresterten Carboxylgruppen sind entsprechende Alkylester, insbesondere solche mit 1-6, vorzugsweise

1–3 Kohlenstoffatomen, in dem Alkylteil, und ferner veresterte Carboxylgruppen, in welchen der Alkoholteil sich von einem phenylsubstituierten Alkylrest ableiten, insbesondere Benzyl, bevorzugt, und ausserdem solche veresterte Carboxylgruppen, in welchen der esterbildende Alkohol ein Phenol oder ein substituiertes Phenol ist.

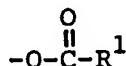
5 Falls die Substituenten R⁴ die Bedeutung von Halogenatomen aufweisen, dann sind diese vorzugsweise Fluor, Chlor oder Bromatome, wobei Chlorsubstituenten speziell bevorzugt sind. Wie bereits erwähnt, können die Substituenten R⁴ auch die Bedeutung von unsubstituierten oder substituierten Phenylresten aufweisen, wobei jedoch vorzugsweise nur ein Substituent R⁴ in der Bedeutung eines unsubstituierten oder substituierten Phenylrestes an den Benzolkern gebunden ist.

10 Die Substituenten R⁴ können an beliebige Stellungen, also die Stellungen 5, 6, 7 oder 8 des Benzolkernes gebunden sein, aus sterischen Gründen sind jedoch die Substituenten vorzugsweise an die Stellung 6 oder 7 gebunden. Auch im Falle, dass zwei Reste R⁴ gemeinsam eine Methylendioxygruppierung der Formel

15 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$

darstellen, ist diese Gruppierung vorzugsweise an die Stellungen 6 und 7 des Benzolkernes gebunden. Speziell bevorzugt, sind Reste R⁴ in der Bedeutung von niederen Alkylgruppen oder niederen Alkoxygruppen an die Stellung 6, und insbesondere an die Stellung 7 des Benzolkernes gebunden, wie zum Beispiel ein an die 7-Stellung gebundener Alkoxyrest mit 1–3 Kohlenstoffatomen, insbesondere ein entsprechender Methoxyrest.

20 Wie aus der Strukturformel I ersichtlich ist, muss in den Wirkstoffen der Formel I, die in den erfundungsgemässen pharmazeutischen Präparaten enthalten sind, an das Stickstoffatom des heterocyclischen Restes, also an die Stellung 4, eine Hydroxygruppe gebunden sein, die gegebenenfalls verestert ist, also als Acyloxygruppe der Formel



25

vorliegt, wobei in diesem Acyloxyrest R¹ die weiter vorne angegebene Bedeutung aufweist.

30 Wenn in den Verbindungen der Formel I R³ ein Acylrest ist, dann bedeutet in diesem R¹ vorzugsweise eine Alkylgruppe mit 1–6 Kohlenstoffatomen, insbesondere eine Alkylgruppe mit 1–3 Kohlenstoffatomen, oder einen phenylsubstituierten Alkylrest, insbesondere einen Benzylrest, oder auch einen gegebenenfalls substituierten Phenylrest. Diese Acylreste leiten sich dementsprechend vorzugsweise von der Ameisensäure, Essigsäure oder Propionsäure oder von der Phenylessigsäure, der Benzoësäure oder einer entsprechend substituierten Benzoësäure, beispielsweise der Salicylsäure, ab.

35 In den Wirkstoffen der Formel I muss an das Kohlenstoffatom der Stellung 2 des Benzolkernes eine Hydroxygruppe oder eine verätherte oder veresterte Hydroxygruppe gebunden sein, wobei die entsprechenden verätherten Hydroxygruppen auch solche mitumfassen, in welchen an das entsprechende Sauerstoffatom ein Zuckerrest über eine Glykosidbindung gebunden ist, in welchen also der Rest R² die Bedeutung von glu aufweist, wobei sich der entsprechende Zuckerrest vorzugsweise von Glucose oder Mannose ableitet.

40 Wenn in den Wirkstoffen der Formel I an das Kohlenstoffatom in der 2-Stellung eine verätherte Hydroxygruppe gebunden ist, dann ist der entsprechende Rest R² vorzugsweise ein unsubstituierter oder substituierter Alkylrest mit 1–6 Kohlenstoffatomen, insbesondere ein solcher mit 1–4 Kohlenstoffatomen, und speziell bevorzugt, ein substituierter oder unsubstituierter Methyl-, Äthyl- oder Propylrest. Von den entsprechenden substituierten Alkylresten sind wieder diejenigen bevorzugt, in welchen die Substituenten Alkoxygruppen, Phenoxygruppen oder Phenylreste sind, wie zum Beispiel ein Rest R² in der Bedeutung eines Methoxymethylrestes, Methoxyäthylrestes, Phenoxyethylrestes oder eines Benzylrestes.

45 Wenn in den Wirkstoffen der Formel I an das Kohlenstoffatom 2 eine acyllierte Hydroxygruppe gebunden ist, d.h. der Rest R² die Bedeutung eines Acylrestes der Formel



55

50 aufweist, dann sind bevorzugte Bedeutungen für diesen Acyrest wieder solche, die sich von niederen aliphatischen oder araliphatischen oder aromatischen Carbonsäuren ableiten, beispielsweise der Ameisensäure, der Essigsäure, der Propionsäure, der Phenylessigsäure, der Benzoësäure oder der Salicylsäure.

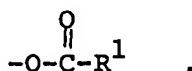
55 In speziell bevorzugten Wirkstoffen der Formel I ist dementsprechend R² ein Wasserstoffatom, ein niederer Alkylrest, ein niederer Aralkylrest, ein glykosidisch gebundener Zuckerrest oder eine Acylgruppe einer niederen aliphatischen Carbonsäure oder allenfalls einer aromatischen Carbonsäure.

Der zweite Rest, der an das Kohlenstoffatom in der 2-Stellung der Wirkstoffe der Formel I gebunden ist, nämlich der Rest R¹, ist vorzugsweise ein Wasserstoffatom, ein unsubstituierter Alkylrest mit 1–6 Kohlenstoffatomen, insbesondere 1–4 Kohlenstoffatomen, und speziell bevorzugt 1 oder 2 Kohlenstoffatomen, oder ein entsprechend substituierter niederer Alkylrest, wobei von den Substituenten Alkoxygruppen, Phenoxygruppen und Phenylreste bevorzugt sind. Des Weiteren kann der Rest R¹ jedoch auch einen unsubstituierten oder substituierten Phenylrest darstellen, in welchem die Substituenten wie weiter vorne definiert sind. Speziell bevorzugte Bedeutungen des Restes R¹ in den Wirkstoffen der Formel I der erfundungsgemäßen pharmazeutischen Präparate sind dementsprechend die Reste Wasserstoff, Alkyl mit 1–3 Kohlenstoffatomen, insbesondere 1 oder 2 Kohlenstoffatomen, und speziell bevorzugt Methyl, Methoxymethyl, Methoxyäthyl, Phenoxyethyl, Phenalkyl, insbesondere Benzyl und allenfalls auch ein Phenylrest.

In bevorzugten Wirkstoffen der Formel I, die in den erfundungsgemäßen pharmazeutischen Präparaten eingesetzt werden, haben dementsprechend die angeführten Substituenten die folgende Bedeutung: n ist 0 oder 1,
R⁴ bedeutet Alkyl oder Alkoxy mit jeweils 1–3 Kohlenstoffatomen, Benzyloxy, Phenoxy oder Hydroxy,
R³ ist Wasserstoff oder ein niedriger aliphatischer Acylrest, die Gruppe der Formel

—O—R²
steht für eine Gruppe der Formel

—O—R¹
oder



30
oder
—O—glu,

35 wobei in diesen Gruppierungen R¹ vorzugsweise Wasserstoff, Alkyl mit 1–3 Kohlenstoffatomen, Phenylalkyl oder Phenyl bedeutet und
glu für einen glykosidisch gebundenen Zuckerrest steht, insbesondere Mannose oder Glucose.

Als spezielle Beispiele für Verbindungen der Formel I, welche die gewünschte Hemmung der unerwünschten Zellvermehrung bei Wirbeltieren zeigen, seien entsprechende Verbindungen der Formel I, in welchen die Reste R¹, R² und R³ Wasserstoff bedeuten und n 0 ist, also das 2,4-Dihydroxy-1,4-benzoxazin-3(4H)-on, welches auch als DIBOA abgekürzt wird, und ferner analog aufgebaute Verbindungen, in welchen n 1 ist, und R⁴ die weiter vorne angegebenen Bedeutungen aufweist, und insbesondere ein Alkylsubstituent oder Alkoxysubstituent mit 1–6 Kohlenstoffatomen ist, wie zum Beispiel ein entsprechender Methoxysubstituent.

45 Im Falle, dass der Substituent R⁴ ein Methoxysubstituent in der 7-Stellung der Struktur ist, ist die entsprechende Verbindung der Formel I das 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-on, welches ebenfalls bereits vor langer Zeit aus Gräsern und Getreide isoliert wurde und in der Literatur auch als DIMBOA abgekürzt wird.

Unterschiedliche Verbindungen der Formel I und pharmazeutisch annehmbare Salze derselben, wie 50 zum Beispiel Alkalimetallsalze von entsprechenden Verbindungen, die in ihrer Struktur eine Carboxylgruppe aufweist, wurden auf ihre Hemmung des unerwünschten Zellwachstums getestet.

Die entsprechenden *in vitro* Tests wurden unter Verwendung von Zell-Linien durchgeführt, die sich von verschiedenen Krebserkrankungen des Menschen ableiten, nämlich menschliche Krebszellen von Harnblasenkrebs, Hodenkrebs, Knochenkrebs, Leberkrebs, Kehlkopfkrebs und Prostatakrebs, und zwar 55 sowohl die Zell-Linie DU-145, die sich von androgen nicht sensitivem Gewebe des Prostatakrebses herleitet, als auch die Zell-Linie mit der Bezeichnung LNCaP, die sich von dem androgen-sensitiven Gewebe des Prostatakrebses herleitet. Die übrigen erwähnten getesteten Zell-Linien waren RT112, TERRA, MG63, CHANG und HEP.

Bei der von menschlichem Prostatakarzinom abgeleiteten Zell-Linie mit der Bezeichnung DU-145, handelt es sich um eine Zell-Linie aus androgen-unabhängigem Adenocarcinoma, das ursprünglich aus Metastasen im Gehirn isoliert wurde. Es sei in diesem Zusammenhang auf die Veröffentlichung von K.R. Stone et al. im Int. J.Cancer 21, 274–281 (1978) verwiesen, in der die Isolierung dieser menschlichen Prostatacarcinom Zell-Linie mit der Bezeichnung DU-145 näher beschrieben wird.

Die Testung der Hemmung der Zellvermehrung erfolgte nach demjenigen Verfahren, das von F.K. Habib, M. Rose, A.C. Buck, L. Ebeling und A. Lewenstein zur Testung der krebshemmenden Wirkung

eines wässrigen Pollenextraktes auf das Wachstum dieser Prostatazellen entwickelt wurde, und das im British J. Urol. 66, Seiten 393–397, (1990) beschrieben ist.

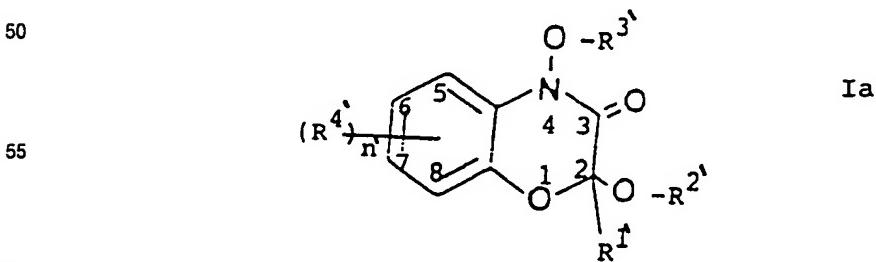
Die in vitro Tests, die mit den anderen genannten Zell-Linien durchgeführt wurden, wurden unter analogen Bedingungen durchgeführt, wie in der oben genannten Veröffentlichung von F.K. Habib et al. beschrieben.

Bei sämtlichen getesteten Verbindungen und getesteten Zell-Linien, zeigte es sich, dass in diesen in vitro Tests bei Konzentrationen von nur 0,1 bis 1 µg der Verbindung der Formel I pro ml Kulturmedium, keine signifikante Hemmung der Zellvermehrung dieser Krebszellen festgestellt werden konnte. Sobald jedoch die Konzentration an der aktiven Verbindung der Formel I auf 2–100 µg pro ml gesteigert wurde, trat bei sämtlichen getesteten Verbindungen und sämtlichen getesteten Tumorzell-Linien eine starke Hemmung bis schliesslich eine vollständige Hemmung des Zellwachstums auf.

Mit Hilfe der erwähnten Zell-Linien der Krebszellen, beispielsweise mit DU-145, wurde die Hemmung der unerwünschten Zellvermehrung auch anhand der Aufnahme von mit Tritium markiertem Thymidin, also von ^3H -Thymidin, durch die fraglichen Krebszellen getestet. Die Durchführung dieses in vitro Tests wird weiter unten noch detailliert beschrieben, und die entsprechenden Kulturen wurden in Anwesenheit eines Wirkstoffs der Formel I, beziehungsweise die Kulturen zu Vergleichszwecken, in Abwesenheit eines derartigen Wirkstoffs während drei bis neun Tagen gezüchtet. In diesem Test zeigte es sich, dass bei sämtlichen getesteten Wirkstoffen der Formel I und bei sämtlichen getesteten Zell-Linien eine deutliche Hemmung der Thymidinaufnahme bei Konzentrationen des Wirkstoffs von 2 µg pro ml bis 100 µg pro ml der Zellkultur auftrat. Bei den Zellen DU-145, war die Thymidinaufnahme bei einer Konzentration des Wirkstoffs von 10 µg pro ml, je nach dem getesteten Wirkstoff, auf 10% bis 60% der Vermehrung, verglichen mit den Kulturen ohne Wirkstoffzugabe (100%) abgesunken.

Die in vivo Testung der Hemmung des Zellwachstums der benignen Prostatahyperplasie des Menschen wurde mit Hilfe des Nacktmaus-Modells nach demjenigen Verfahren durchgeführt, das von B. Wagner, U. Otto, H. Becker, S. Schröder und H. Kosterhalßen in dem Buch «Benigne Prostatopathien», Hrsg. W. Vahlensieck und G. Rutishauser, G. Thieme Verlag, Stuttgart, S. 129–133 (1992) beschrieben ist. Bei diesem Verfahren werden männlichen, drei Monate alten MNRI nu/nu Mäusen, die Hoden entfernt, und einen Tag danach wird das menschliche Gewebe subkutan auf beide Thoraxseiten implantiert. Das Wachstum des transplantierten menschlichen Gewebes wurde hormonell mit Dihydrotestosteron und Östradiol stimuliert, die Grösse der Tumore wurde in der Versuchsgruppe unter Verabreichung der Wirkstoffe der Formel I und in der Vergleichsgruppe ohne Verabreichung dieser Wirkstoffe getestet. Die Wirkstoffe der Formel I wurden an die Tiere der Testgruppe oral verabreicht. Die entsprechenden Wirkstoffe der Formel I wurden an die Tiere in einer Menge von 0,2 mg–20 mg, z.B. 0,4–0,6 mg pro kg Körpergewicht pro Tag verabreicht. Die orale Behandlung erfolgte eine Woche nach der Transplantation und wurde bis zur sechsten Woche nach der Transplantation fortgesetzt. Ein Vergleich der hormonstimulierten Gruppe ohne Verabreichung mit der hormonstimulierten Gruppe mit der Verabreichung der Wirkstoffe der Formel I, zeigte ein Anwachsen der transplantierten Tumore auf mehr als den doppelten Wert ohne Verabreichung der Wirkstoffe, während die transplantierten Tumore auf ein Volumen unterhalb des Volumens vor der Behandlung in der Gruppe mit Hormonstimulierung plus Verabreichung der Wirkstoffe stattgefunden hatte. In manchen Fällen war die Tumogrösse auf weniger als die Hälfte des Wertes vor der Behandlung, nach vier Wochen, beziehungsweise nach sechs Wochen Behandlung, gesunken.

Wie bereits erwähnt wurde, gehören zu den in den erfindungsgemässen Mitteln eingesetzten Wirkstoffen der Formel I sowohl solche, die bereits in der Literatur beschrieben sind, als auch entsprechende neue chemische Verbindungen. Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung, sind dementsprechend neue Derivate von 2,4-Dihydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-onen, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie die folgende Formel Ia

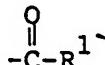


aufweisen, wobei in dieser Formel Ia

R¹ Wasserstoff, ein unsubstituierter Alkylrest mit 1–6 Kohlenstoffatomen, ein substituierter Alkylrest mit 1–6 Kohlenstoffatomen im Alkylteil, der als Substituenten 1–3 Substituenten trägt, die unabhängig voneinander aus der Gruppe ausgewählt sind, welche Halogenatome, Hydroxygruppen, Alkoxygruppen mit jeweils 1–6 Kohlenstoffatomen, Phenoxygruppen, Carbonsäuregruppen, veresterte Carbonsäuregruppen

und Phenylreste umfasst, ein unsubstituierter Phenylrest, oder ein substituierter Phenylrest ist, der 1–3 Substituenten aufweist, welche aus der Gruppe ausgewählt sind, welche die Substituenten Alkyl mit 1–6 Kohlenstoffatomen, Hydroxy, Alkoxy, Acyloxy, Carbonsäuregruppen und Carbonsäureestergruppen und Halogenatome umfasst,

5 R² Wasserstoff, einen Acylrest der Formel



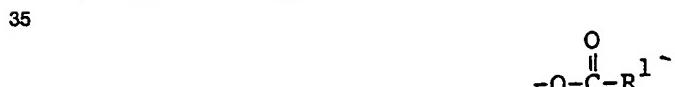
- 10 in welchem R¹ die oben angegebene Bedeutung besitzt, einen glykosidisch gebundenen Zuckerrest, einen unsubstituierten Alkylrest mit 1–6 Kohlenstoffatomen, einen substituierten Alkylrest mit 1–6 Kohlenstoffatomen im Alkylteil, der als Substituenten 1 bis 3 Substituenten trägt, die unabhängig voneinander aus der Gruppe ausgewählt sind, welche Halogenatome, Hydroxygruppen, Alkoxygruppen mit jeweils 1–6 Kohlenstoffatomen, Phenoxygruppen, Carbonsäuregruppen, veresterte Carbonsäuregruppen und Phenylreste umfasst, einen unsubstituierten Phenylrest oder einen substituierten Phenylrest bedeutet, der 1 bis 3 Substituenten aufweist, welche unabhängig voneinander aus der Gruppe ausgewählt sind, die Alkylgruppen mit 1–6 Kohlenstoffatomen, Hydroxygruppen, Alkoxygruppen, Acyloxygruppen, Carbonsäuregruppen, Carbonsäureestergruppen und Halogenatome umfasst,
- 15 R³ für ein Wasserstoffatom oder eine Acylgruppe der Formel
- 20



- 25 steht, in welcher R¹ die oben angegebene Bedeutung besitzt,
n' eine ganze Zahl im Bereich von 0–4 bedeutet, und die Substituenten
R⁴ unabhängig voneinander für Alkylreste mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, substituierte Alkylreste mit 1–6 Kohlenstoffatomen im Alkylteil, die als Substituenten Hydroxygruppen, Alkoxygruppen, Phenoxygruppen oder Phenylreste tragen, freie oder verätherte Hydroxygruppen der Formel
- 30



oder acyierte Hydroxygruppen der Formel

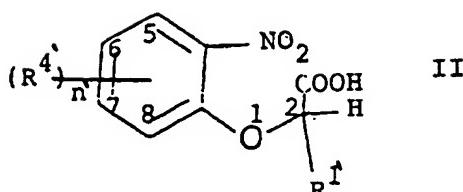


- 40 stehen, wobei in diesen Gruppierungen R¹ die oben angegebene Bedeutung besitzt oder freie oder veresterte Carboxylgruppen, Halogenatome, unsubstituierte Phenylreste oder substituierte Phenylreste bedeuten, die 1–3 Substituenten aufweisen, welche aus der Gruppe ausgewählt sind, welche die Substituenten Alkyl mit 1–6 Kohlenstoffatomen, Hydroxy, Alkoxy, Acyloxy, Carbonsäuregruppen und Carbonsäureestergruppen und Halogenatome umfasst, oder der Rest R⁴ bedeutet, einen glykosidisch gebundenen Zuckerrest oder 2 an benachbarte Kohlenstoffatome des Benzolkerns gebundene Reste R⁴ stellen gemeinsam eine Gruppe
- 45 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$ oder $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ dar,
unter der Voraussetzung, dass dann, wenn n' 0 oder 1 ist, und ausserdem R⁴ ein Alkylrest mit 1–6 Kohlenstoffatomen, ein Alkoxyrest mit 1–6 Kohlenstoffatomen, ein Halogenatom oder eine unsubstituierter oder substituierter Phenylrest ist, und ausserdem R³ ein Wasserstoffatom bedeutet und ferner R² für Wasserstoff, Alkyl mit 1–6 Kohlenstoffatomen oder einen glykosidisch gebundenen Zuckerrest steht, der Rest R¹ eine andere Bedeutung aufweisen muss als diejenige eines Wasserstoffatoms, sowie Salze der Verbindungen der Formel Ia.
- 50

Die neuen Verbindungen der Formel Ia können nach Verfahren hergestellt werden, die für die Herstellung derartiger heterocyclischer Verbindungen, die in ihrem heterocyclischen Ringteil, sowohl ein Stickstoffatom als auch ein Sauerstoffatom aufweisen, bereits bekannt sind. Beispielsweise kann die Herstellung nach demjenigen Verfahren durchgeführt werden, das in der US-Patentschrift 3 862 180 für die bereits bekannten Verbindungen der weiter vorn angegebenen Struktur B beschrieben ist. Vorzugsweise erfolgt jedoch die Herstellung nach demjenigen Verfahren, das für die Verbindung mit der Abkürzung DIBOA in der DDR-Patentschrift 264 694 beschrieben ist. Nach den dort beschriebenen Herstellungsverfahren wird zunächst durch eine Zyklyisierung einer Nitroverbindung der Formel II

60

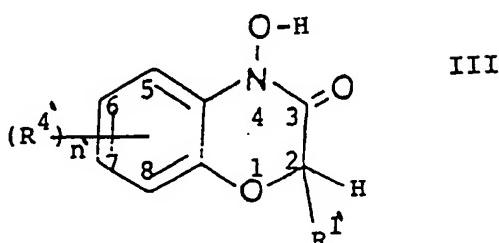
5



10 eine entsprechende heterocyclische Verbindung der Formel III

15

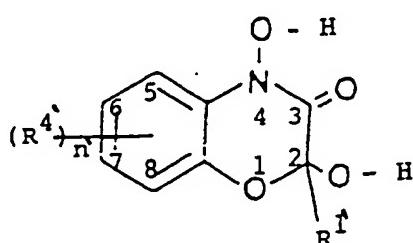
20



hergestellt. Diese heterocyclische Verbindung wird dann durch Umsetzung mit Brom zu der entsprechenden 2-Bromverbindung bromiert und anschliessend wird das Bromatom in der 2-Stellung durch Hydrolyse mit feuchtem Silbercarbonat gegen eine Hydroxygruppe ausgetauscht, wobei man die entsprechende 2,4-Dihydroxyverbindung der folgenden Formel

30

35



erhält. Die so erhaltenen Verbindungen können als Wirkstoffe der Formel I in den erfindungsgemässen pharmazeutischen Präparaten eingesetzt werden. Die so erhaltenen Verbindungen stellen ferner neue erfindungsgemässen Derivate der Formel Ia dar, falls in ihnen entweder der Rest R1' eine andere Bedeutung aufweist als diejenige eines Wasserstoffatoms und R4' und n' irgendeine der Bedeutungen gemäss dem Anspruch 8 aufweist, oder falls in ihnen R1' ein Wasserstoffatom ist und n' entweder eine ganze Zahl im Bereich von 2-4 darstellt, oder n' 1 ist und ausserdem R4' eine andere Bedeutung besitzt als diejenige eines Alkylrestes mit 1-6 Kohlenstoffatomen, eines Alkoxyrestes mit 1-6 Kohlenstoffatomen, eines Halogenatoms oder eines unsubstituierten oder substituierten Phenylrestes.

Die so erhaltenen Verbindungen der oben angegebenen Formeln können durch weitere Umsetzungen in entsprechende neue Verbindungen der Formel Ia umgewandelt werden, in welchen R2' eine andere Bedeutung aufweist als diejenige eines Wasserstoffatoms und beispielsweise einen Acylrest bedeutet oder in denen R3' eine Acylgruppe der im Zusammenhang mit Formel Ia weiter vorne angegebenen Struktur besitzt. Diese weiteren Umsetzungen zur Einführung der entsprechenden Substituenten können nach an sich bekannten Arbeitsverfahren durchgeführt werden, beispielsweise durch Acylierungen.

Die Erfindung wird nun anhand der nun folgenden Beispiele näher erläutert, die lediglich zur Illustration von speziellen Ausführungsarten der erfindungsgemässen pharmazeutischen Mittel dienen und in keiner Weise als Einschränkungen zu betrachten sind.

Beispiel 1

Bestimmung der Aufnahme von ³H-Thymidin durch lebende Krebszellen

In diesem Beispiel wurden menschliche Prostatacarzinomzellen der Zell-Linie DU-145 untersucht. Analoge Untersuchungen wurden ferner an sechs weiteren Zell-Linien, nämlich den Zell-Linien RT112, Terra, MG63, Chang, Hep und LNCaP durchgeführt, die ebenfalls aus menschlichen Krebsgeschwülsten abgeleitet sind, wie dies weiter vorne näher erläutert wird.

Die Zellen befanden sich im subconfluenten Stadium, und sie wurden mit Dulbecco «A» phosphatgepufferter Kochsalzlösung und einmal mit 0,25% Trypsin und 0,2% EDTA gespült. Die Zellen wurden fünf Minuten lang bei 37°C gebrütet und anschliessend wieder in einem serumfreien Medium, das als «SFM» abgekürzt wird, erneut suspendiert. Die Zählung der Zellen wurde in drei Parallelbestimmungen durchgeführt, indem man Schalen und eine Haemocytometer-Kammer verwendete. $1,5 \times 10^3$ Zellen bis $1,5 \times 10^4$ Zellen wurden über Nacht ausplattiert, und zwar in SFM, dem 0,5% an fötalem Kälberserum (erhältlich von der Firma Gibco), zur Unterstützung der Plattierung zugesetzt worden war. Das Ausplattieren erfolgte auf Kulturplatten mit 96 Vertiefungen (Cell-Cult). Das Plattierungsmedium wurde dann durch SFM ersetzt (im Falle der Durchführung der Vergleichsversuche), beziehungsweise durch SFM, welches außerdem den zu testenden Wirkstoff der Formel I der erfundungsgemässen pharmazeutischen Präparate enthielt. Die Züchtung in dem SFM, beziehungsweise in dem SFM plus Verbindung der Formel I, erfolgte während 5–6 Tagen. Nach dieser Anzüchtungszeit wurde das mit Tritium markierte Thymidin zugesetzt, und zwar verwendete man Methyl- 3 H-Thymidin (37 kBq pro Vertiefung, spezifische Aktivität 75 GBq mmol $^{-1}$; Amersham International) in dem Kulturmedium RPMI 1640 der Firma Gibco, und führte diese Behandlung während mindestens vier Stunden durch. Das Medium in jeder Vertiefung wurde abgesaugt, es wurde wieder suspendiert, ehe man 10% an eiskalter Trichloressigsäure zusetzte. Die Zellen wurden dann zwei Stunden später auf Filtermatten gesammelt, und hierzu wurde eine Vorrichtung der Bezeichnung Skatron Combi Cell Harvester verwendet. Das Sammeln der Zellen erfolgte indem man jede Vertiefung dreimal mit Wasser wusch und zum Abschluss dieser Aufsammlung der Zellen wurden die Filtermatten bei 60°C während 30 Minuten getrocknet. Jede so gewonnene Scheibe an der Filtermatte (Filterpapier) enthielt das ausfällbare Material und die Bestimmung des Tritiumgehaltes wurde durch Zählung in einer Scintillationsflüssigkeit durchgeführt. Insgesamt wurde die Züchtung in Anwesenheit der die Zellvermehrung hemmenden Verbindung der Formel I, beziehungsweise in Abwesenheit desselben bei den Vergleichsversuchen, während 3–9 Tagen durchgeführt.

Beispiel 2

Das 2,4-Dihydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-on (also DIBOA) wurde nach demjenigen Verfahren hergestellt, das in der DDR-Patentschrift 264 694 beschrieben ist.

Nach dem im Beispiel 1 beschriebenen Verfahren wurden Prostatakrebszellen der Zell-Linie DU-145 getestet, wobei pro Vertiefung der Testplatte 1500 Zellen enthalten waren.

In der Serie zu Vergleichszwecken enthielt das Medium kein DIBOA. In den Testserien enthielt das Medium 2 µg/ml, beziehungsweise 10 µg/ml, beziehungsweise 100 µg/ml an der synthetisch hergestellten Verbindung DIBOA. Die Aufnahme des Tritium markierten Thymidines in der Gruppe zu Vergleichszwecken wurde an jedem der Tage 1–5 der Bebrütung mit 100% festgesetzt.

In der Testgruppe mit einer Konzentration von 1/ug DIBOA pro ml betrug die Thymidinaufnahme an den Testtagen 1 und 2 80% des Wertes der Vergleichsgruppe, stieg dann bis zum Tag 4 auf 92% an und sank dann am Tag 5 wieder auf 87% ab.

In der Testgruppe in der die Konzentration an DIBOA 10 µg/ml betrug, sank die Thymidinaufnahme am Testtag 1 auf 48%, verglichen mit der Gruppe zu Vergleichszwecken, ab, stieg dann am Testtag 2 leicht an und erreichte schliesslich an den Testtagen 3, 4 und 5 Werte im Bereich von 35–40% der Gruppe zu Vergleichszwecken.

In der Testgruppe mit einer Konzentration von 100 µg/ml DIBOA war die Thymidinaufnahme am Tage 1 bereits auf 8% des Wertes der Vergleichsgruppe abgesunken, und sie sank nach einem schwachen Anstieg am Tag 2, schliesslich am Testtag 5 bis auf 2% der Vergleichsgruppe ab.

In den Wirkstoffen der Formel I ist das Kohlenstoffatom in der Stellung 2 des heterocyclischen Rings ein optisch aktives Kohlenstoffatom. Bei dem synthetisch hergestellten DIBOA liegt natürlich ein Racemat vor, in welchem die beiden Enantiomeren im Verhältnis 1:1 vorliegen.

Analoge Tests, wie mit dem synthetisch hergestellten DIBOA, wurden mit DIBOA durchgeführt, das aus Roggen isoliert wurde. Dabei zeigte es sich, dass der entsprechende Naturstoff etwa doppelt so wirksam war, wie das synthetisch hergestellte Produkt. Es ist anzunehmen, dass in dem Naturstoff das Enantiomerenverhältnis nicht 1:1 ist, sondern eine höhere Konzentration an einem der beiden Entantioneren vorliegt, und gegebenenfalls der Naturstoff nur aus einem der beiden Antipoden besteht.

Entsprechende Versuche, die Antipoden des synthetisch hergestellten DIBOA zu trennen, werden derzeit durchgeführt, um feststellen zu können, welcher der beiden Antipoden die Wirksamkeit, beziehungsweise die höhere Wirksamkeit besitzt, die unerwünschte Zellvermehrung zu hemmen.

Beispiel 3

Neue Derivate des gemäss Beispiel 2 synthetisch hergestellten DIBOA wurden synthetisiert, indem man das DIBOA einer Acetylierung mit Essigsäureanhydrid unterwarf. Dabei erhielt man entsprechende Acetylierungsprodukte der Formel I, in welchen der Rest R² oder Rest R³ oder beide Reste R² und R³, Acetylgruppen der Formel

-CO-CH₃

waren.

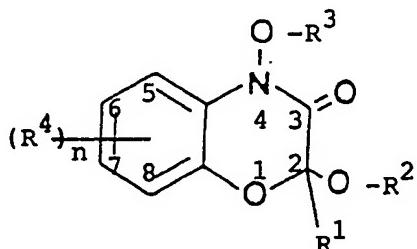
In dem im Beispiel 2 beschriebenen Testverfahren wiesen die Acetylierungsprodukte eine etwas höhere hemmende Wirkung auf, als das synthetisch hergestellte DIBOA.

Beispiel 4

Orientierende Vorversuche lassen darauf schliessen, dass die synthetisch hergestellte Verbindung DIBOA und Derivate derselben, zusätzlich noch eine antivirale Aktivität besitzen.

Patentansprüche

1. Pharmazeutisches Präparat zur Hemmung unerwünschter Zellvermehrung bei Wirbeltieren, dadurch gekennzeichnet, dass es als Wirkstoff mindestens ein 2,4-Dihydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-on oder ein Derivat davon der Formel I

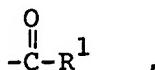


I

enthält, wobei in dieser Formel I

R¹ Wasserstoff, ein unsubstituierter Alkylrest mit 1–6 Kohlenstoffatomen, ein substituierter Alkylrest mit 1–6 Kohlenstoffatomen im Alkynteil, der als Substituenten 1–3 Substituenten trägt, die unabhängig voneinander aus der Gruppe ausgewählt sind, welche Halogenatome, Hydroxygruppen, Alkoxygruppen mit jeweils 1–6 Kohlenstoffatomen, Phenoxygruppen, Carbonsäuregruppen, veresterte Carbonsäuregruppen und Phenylreste umfasst, ein unsubstituierter Phenylrest, oder ein substituierter Phenylrest ist, der 1–3 Substituenten aufweist, welche aus der Gruppe ausgewählt sind, welche die Substituenten Alkyl mit 1–6 Kohlenstoffatomen, Hydroxy, Alkoxy, Acyloxy, Carbonsäuregruppen und Carbonsäureestergruppen und Halogenatome umfasst,

R² Wasserstoff, einen Acylrest der Formel



45

in welchem R¹ die oben angegebene Bedeutung besitzt, einen glykosidisch gebundenen Zuckerrest, einen unsubstituierten Alkylrest mit 1–6 Kohlenstoffatomen, einen substituierten Alkylrest mit 1–6 Kohlenstoffatomen im Alkynteil, der als Substituenten 1 bis 3 Substituenten trägt, die unabhängig voneinander aus der Gruppe ausgewählt sind, welche Halogenatome, Hydroxygruppen, Alkoxygruppen mit jeweils 1–6 Kohlenstoffatomen, Phenoxygruppen, Carbonsäuregruppen, veresterte Carbonsäuregruppen und Phenylreste umfasst, einen unsubstituierten Phenylrest oder einen substituierten Phenylrest bedeutet, der 1 bis 3 Substituenten aufweist, welche unabhängig voneinander aus der Gruppe ausgewählt sind, die Alkylgruppen mit 1–6 Kohlenstoffatomen, Hydroxygruppen, Alkoxygruppen, Acyloxygruppen, Carbonsäuregruppen, Carbonsäureestergruppen und Halogenatome umfasst,

55 R³ für ein Wasserstoffatom oder eine Acylgruppe der Formel



60

steht, in welcher R¹ die oben angegebene Bedeutung besitzt,

n eine ganze Zahl im Bereich von 0–4 bedeutet, und die Substituenten

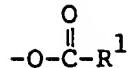
R⁴ unabhängig voneinander für Alkylreste mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, substituierte Alkylreste mit 1–6 Kohlenstoffatomen im Alkynteil, die als Substituenten Hydroxygruppen, Alkoxygruppen, Phenoxygruppen oder Phenylreste tragen, freie oder verätherte Hydroxygruppen der Formel

65

-O-R¹

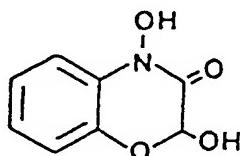
oder acylierte Hydroxygruppen der Formel

5



- 10 stehen, wobei in diesen Gruppierungen R¹ die oben angegebene Bedeutung besitzt oder freie oder veresterte Carboxylgruppen, Halogenatome, unsubstituierte Phenylreste oder substituierte Phenylreste bedeuten, die 1-3 Substituenten aufweisen, welche aus der Gruppe ausgewählt sind, welche die Substituenten Alkyl mit 1-6 Kohlenstoffatomen, Hydroxy, Alkoxy, Acyloxy, Carbonsäuregruppen und Carbonsäureestergruppen und Halogenatome umfasst, oder der Rest R⁴ bedeutet einen glykosidisch gebundenen Zuckerrest oder 2 an benachbarte Kohlenstoffatome des Benzolkerns gebundene Reste R⁴ stellen gemeinsam eine Gruppe
- 15 -O-CH₂-O- oder -O-CH₂-CH₂-O- dar, oder pharmazeutisch annehmbare Salze der Verbindungen der Formel I enthalten.
- 20 2. Pharmazeutisches Präparat gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es als Wirkstoff eine Verbindung der Formel I enthält, in welcher
- n 0 oder 1 ist und
- R⁴ Alkoxy mit 1-3 Kohlenstoffatomen bedeutet, vorzugsweise Methoxy in der Stellung 7 oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz der Verbindung der Formel I.
- 25 3. Pharmazeutisches Präparat gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es als Wirkstoff eine Verbindung der Formel I enthält, in welcher R³ Wasserstoff ist, oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz dieser Verbindung der Formel I.
- 30 4. Pharmazeutisches Präparat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es als Wirkstoff eine Verbindung der Formel I enthält, in welcher R² Wasserstoff oder einen glykosidisch gebundenen Zuckerrest darstellt oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz dieser Verbindung der Formel I enthält.
- 35 5. Pharmazeutisches Präparat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es als Wirkstoff eine Verbindung der Formel I enthält, in welcher R¹ Wasserstoff oder ein unsubstituierter Alkylrest mit 1 bis 3 Kohlenstoffatomen ist oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz dieser Verbindung der Formel I.
- 36 6. Pharmazeutisches Präparat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass es als Wirkstoff der Formel I die Verbindung der folgenden Struktur

40



45

oder ein Glykosid dieser Verbindung der folgenden Formel

50

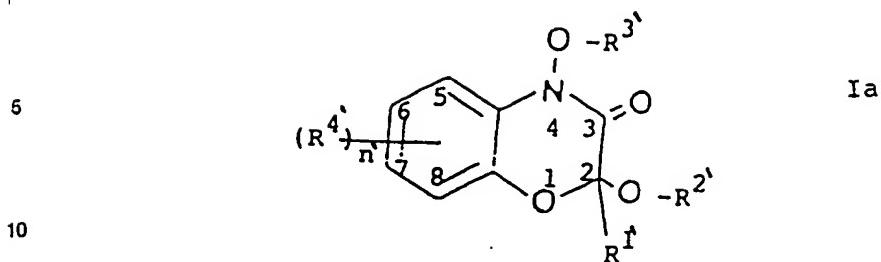


55

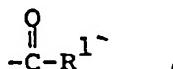
enthält,
wobei in dem Glykosid das Symbol glu einen über eine Glykosidbindung gebundenen Zuckerrest, insbesondere einen Glucose- oder Mannoserest darstellt.

60 7. Derivate von 2,4-Dihydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-onen, dadurch gekennzeichnet, dass sie die folgende Formel Ia

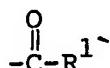
65



aufweisen, wobei in dieser Formel Ia
 15 R^{1'} Wasserstoff, ein unsubstituierter Alkylrest mit 1–6 Kohlenstoffatomen, ein substituierter Alkylrest mit
 20 1–6 Kohlenstoffatomen im Alkylteil, der als Substituenten 1–3 Substituenten trägt, die unabhängig voneinander aus der Gruppe ausgewählt sind, welche Halogenatome, Hydroxygruppen, Alkoxygruppen mit jeweils 1–6 Kohlenstoffatomen, Phenoxygruppen, Carbonsäuregruppen, veresterte Carbonsäuregruppen und Phenylreste umfasst, ein unsubstituierter Phenylrest, oder ein substituierter Phenylrest ist, der 1–3 Substituenten aufweist, welche aus der Gruppe ausgewählt sind, welche die Substituenten Alkyl mit 1–6 Kohlenstoffatomen, Hydroxy, Alkoxy, Acyloxy, Carbonsäuregruppen und Carbonsäureestergruppen und Halogenatome umfasst,
 25 R^{2'} Wasserstoff, einen Acylrest der Formel

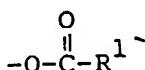


In welchem R^{1'} die oben angegebene Bedeutung besitzt, einen glykosidisch gebundenen Zuckerrest, einen unsubstituierten Alkylrest mit 1–6 Kohlenstoffatomen, einen substituierten Alkylrest mit 1–6 Kohlenstoffatomen im Alkylteil, der als Substituenten 1 bis 3 Substituenten trägt, die unabhängig voneinander aus der Gruppe ausgewählt sind, welche Halogenatome, Hydroxygruppen, Alkoxygruppen mit jeweils 1–6 Kohlenstoffatomen, Phenoxygruppen, Carbonsäuregruppen, veresterte Carbonsäuregruppen und Phenylreste umfasst, einen unsubstituierten Phenylrest oder einen substituierten Phenylrest bedeutet, der 1 bis 3 Substituenten aufweist, welche unabhängig voneinander aus der Gruppe ausgewählt sind, die Alkylgruppen mit 1–6 Kohlenstoffatomen, Hydroxygruppen, Alkoxygruppen, Acyloxygruppen, Carbonsäuregruppen, Carbonsäureestergruppen und Halogenatome umfasst,
 35 R^{3'} für ein Wasserstoffatom oder eine Acylgruppe der Formel



steht, in welcher R^{1'} die oben angegebene Bedeutung besitzt,
 n' eine ganze Zahl im Bereich von 0–4 bedeutet, und die Substituenten
 45 R^{4'} unabhängig voneinander für Alkylreste mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, substituierte Alkylreste mit 1–6 Kohlenstoffatomen im Alkylteil, die als Substituenten Hydroxygruppen, Alkoxygruppen, Phenoxygruppen oder Phenylreste tragen, freie oder verätherte Hydroxygruppen der Formel

50 –O–R^{1'}
 oder acylierte Hydroxygruppen der Formel



60 stehen, wobei in diesen Gruppierungen R^{1'} die oben angegebenen Bedeutung besitzen oder freie oder veresterte Carboxylgruppen, Halogenatome, unsubstituierte Phenylreste oder substituierte Phenylreste bedeuten, die 1–3 Substituenten aufweisen, welche aus der Gruppe ausgewählt sind, welche die Substituenten Alkyl mit 1–6 Kohlenstoffatomen, Hydroxy, Alkoxy, Acyloxy, Carbonsäuregruppen und Carbonsäuregruppen und Halogenatome umfasst, oder der Rest R^{4'} bedeutet einen glykosidisch gebundenen Zuckerrest oder 2 an benachbarte Kohlenstoffatome des Benzolkerns gebundene Reste R^{4'} stellen gemeinsam eine Gruppe –O–CH₂–O– oder –O–CH₂–CH₂–O– dar,
 65 unter der Voraussetzung, dass dann, wenn n' 0 oder 1 ist, und ausserdem R^{4'} ein Alkylrest mit 1–6

Kohlenstoffatomen, ein Alkoxyrest mit 1-6 Kohlenstoffatomen, ein Halogenatom oder eine unsubstituierter oder substituierter Phenylrest ist, und außerdem R³ ein Wasserstoffatom bedeutet und ferner R², für Wasserstoff, Alkyl mit 1-6 Kohlenstoffatomen oder einen glykosidisch gebundenen Zuckerrest steht, der Rest R¹ eine andere Bedeutung aufweisen muss als diejenige eines Wasserstoffatoms, sowie
5 Salze der Verbindungen der Formel Ia.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65